

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-155493

(43) 公開日 平成10年(1998) 6月16日

(51) IntCl. ⁴	識別記号	FI	
C12N 15/09	ZNA	C12N 15/00	ZNAA
1/19		1/19	
5/10		9/18	D
9/16		C12N 5/00	B
# (C12N 15/09	ZNA		

審査請求 未請求 請求項の数15 OL (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平9-270967	(71) 出願人	000001858 三共株式会社 東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号
(22) 出願日	平成9年(1997)10月3日	(72) 発明者	渡辺 一郎 東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内
(31) 優先権主張番号	特願平8-264241	(72) 発明者	小石 龍太 東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内
(32) 優先日	平8(1996)10月4日	(72) 発明者	矢尾 嘉生 東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内
(33) 優先権主張国	日本 (JP)	(74) 代理人	弁理士 大野 彰夫 (外2名) 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アスペルギルス属由来のホスホリパーゼA1をコードする遺伝子

(57) 【要約】

【課題】 アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) 由来のホスホリパーゼA1 (PLA1) をコードする遺伝子、および該遺伝子で形質転換された宿主を培養することによる組換えPLA1の製造方法を提供する。

【解決手段】 配列表の配列番号2のアミノ酸番号1～269で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはその改変体をコードする遺伝子、該遺伝子を含むことからなるベクターおよび該ベクターで形質転換された宿主細胞。

phospholipase

from *Aspergillus oryzae* (strain)

(2)

特開平10-155493

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号2のアミノ酸番号1～269で示されるアミノ酸配列を含むことからなり、ホスホリパーゼ活性を有するポリペプチド、または配列表の配列番号2のアミノ酸番号1～269で示されるアミノ酸配列中の1つもしくは2つ以上の部位において1つもしくは2つ以上のアミノ酸が置換、欠失または挿入されているアミノ酸配列からなり、ホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

【請求項2】 配列表の配列番号2のアミノ酸番号1～269で示されるアミノ酸配列を含むことからなり、ホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

【請求項3】 配列表の配列番号1のヌクレオチド番号1～885で示されるヌクレオチド配列を含むことからなるDNA。

【請求項4】 請求項3に記載のDNAとハイブリダイズし、ホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

【請求項5】 請求項3に記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、ホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

【請求項6】 請求項3に記載のDNAと6×SSC、60～70℃の条件下でハイブリダイズし、ホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

【請求項7】 請求項1乃至6のいずれか1つに記載のDNAを含むことからなる組換えDNAベクター。

【請求項8】 プラスミド pCY339である、請求項7記載の組換えDNAベクター。

【請求項9】 プラスミド pAAPである、請求項7記載の組換えDNAベクター。

【請求項10】 請求項7乃至9のいずれか1つに記載の組換えDNAベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項11】 サッカロミセス・セレビジェ KS58-2D/pCY339である、請求項10記載の宿主細胞。

【請求項12】 アスペルギルス・オリゼ M-2-3/pAAPである、請求項10記載の宿主細胞。

【請求項13】 遺伝子操作によって得られ、配列表の配列番号2のアミノ酸番号1～269で示されるアミノ酸配列を含むことからなり、ホスホリパーゼ活性を有するポリペプチド、または配列表の配列番号2のアミノ酸番号1～269で示されるアミノ酸配列中の1つもしくは2つ以上の部位において1つもしくは2つ以上のアミノ酸が置換、欠失または挿入されているアミノ酸配列からなり、ホスホリパーゼ活性を有するポリペプチド。

【請求項14】 遺伝子操作によって得られ、配列表の配列番号2のアミノ酸番号1～269で示されるアミノ酸配列を含むことからなり、ホスホリパーゼ活性を有するポリペプチド。

2

【請求項15】 請求項10乃至12のいずれか1つに記載の宿主細胞を、ホスホリパーゼの産生可能な条件下で培養し、次いで、該培養物からホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドを回収することを特徴とする、該ポリペプチドの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、麹菌アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) のホスホリパーゼA1をコードする遺伝子、該遺伝子を含むことからなる組換えDNAベクター、該ベクターで形質転換させた宿主細胞および該宿主細胞を用いた組換えホスホリパーゼA1の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 レシチンは界面活性作用、酸化防止作用、生理活性作用等を有するリン脂質で、食品工業用、飼料用、医薬品用と幅広く使用されている。レシチンの界面活性作用は、他の食品界面活性剤に比べ、乳化安定性に劣るため、酵素分解を用いて、乳化安定性を改善する研究がなされている。リゾリン脂質は、リン脂質のグリセリン残基にエステル結合した脂肪酸の一部を加水分解して得られる部分分解リン脂質であり、リン脂質に比べて水溶性が増すに伴い、乳化性が増強し、乳化力を発揮する温度領域が拡大して、油または水系のいずれに添加しても乳化力を発揮すること、カルシウム、マグネシウム等の金属イオンが高濃度で共存しても乳化力が低下しないこと、酸性下での乳化安定性が良いこと等の特性が付与されると報告されている [Yanano, Y. and Gohntani, S. (1996) Abstract of 4th World Surfactants Congress P-84 参照]。

【0003】 現在、酵素を利用してリン脂質を分解したリゾリン脂質が市販されているが、これはブタ肝臓から調製された酵素剤パンクレアチンに含まれるホスホリパーゼA2活性を用いたものであり、この酵素剤には臓器特有の臭みがあったり、供給量に制限があり価格が高いこと等が問題とされ、パンクレアチンに代わるホスホリパーゼAの給源が求められている。また、既にいくつかの微生物が生産するホスホリパーゼA [特開昭58-212783参照] やリパーゼ類 [特開昭63-42691参照] を利用したリン脂質の分解方法が示され、また、「酵素の宝庫」と呼ばれている麹カビ、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) 起源のタカチアスターゼ (登録商標) にも、古くから、リン脂質分解活性を含むリパーゼの存在が知られていた [Contardi, A. and Ercoli, A. (1933) Biochem. Z. 251, 275-302 および Blain, J. A., et al. (1978) FEMS Microbiology Letters 3, 85-87 参照] が、これらの酵素を用いる方法は、酵素活性がパンクレアチンに比べて低かったり、基質特異性に劣る酵素を利用した場合には、リゾリン脂質の収量が悪化したり、副生物の共存によるリゾリン脂質

(3)

特開平10-155493

3

品質の低下を招く等の欠点がある。従って、上記の同点、欠点を克服するため、優れた活性および選択性を有し、安価に定量的に供給できる酵素の開発が望まれていた。発明者は、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属の糸状菌が生産するホスホリパーゼを単離精製して、優れた活性および選択性を有する、高度に精製されたホスホリパーゼA1を見いだしている〔特開平6-62850参照〕。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 ホスホリパーゼA1をコードする遺伝子をクローニングし、他の宿主細胞で大量発現させることが可能になれば、該酵素の生産効率の大幅な向上が期待できる。

【0005】すなわち、本発明の目的は、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) のホスホリパーゼA1をコードする遺伝子、該遺伝子を含むことからなる組換えDNAベクター、該ベクターで形質転換された宿主細胞および該宿主細胞を用いた組換えホスホリパーゼA1の製造方法を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明は、(1) 配列表の配列番号2のアミノ酸番号1~269で示されるアミノ酸配列を含むことからなり、ホスホリパーゼ活性を有するポリペプチド、または配列表の配列番号2のアミノ酸番号1~269で示されるアミノ酸配列中の1つもしくは2つ以上の部位において1つもしくは2つ以上のアミノ酸が置換、欠失または挿入されているアミノ酸配列からなり、ホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA、(2) 配列表の配列番号2のアミノ酸番号1~269で示されるアミノ酸配列を含むことからなり、ホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA、(3) 配列表の配列番号1のヌクレオチド番号1~885で示されるヌクレオチド配列を含むことからなるDNA、(4) (3)に記載のDNAとハイブリダイズし、ホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA、(5) (3)に記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、ホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA、(6) (3)に記載のDNAと6×SSC、60~70℃の条件下でハイブリダイズし、ホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA、(7) (1)~(6)のいずれか1つに記載のDNAを含むことからなる組換えDNAベクター、(8)

プラスミド pCY339である、(7)に記載の組換えDNAベクター、(9) プラスミド pAAPである、(7)に記載の組換えDNAベクター、(10)

(7)または(9)のいずれか1つに記載の組換えDNAベクターで形質転換された宿主細胞、(11) サッカロミセス・セレビシエ KS58-2D/pCY339である、(10)に記載の宿主細胞、(12) アスペル

4

ギルス・オリゼ M-2-3/pAAPである、(10)に記載の宿主細胞、(13) 遺伝子操作によって得られ、配列表の配列番号2のアミノ酸番号1~269で示されるアミノ酸配列を含むことからなり、ホスホリパーゼ活性を有するポリペプチド、または配列表の配列番号2のアミノ酸番号1~269で示されるアミノ酸配列中の1つもしくは2つ以上の部位において1つもしくは2つ以上のアミノ酸が置換、欠失または挿入されているアミノ酸配列からなり、ホスホリパーゼ活性を有するポリペプチド、(14) 遺伝子操作によって得られ、配列表の配列番号2のアミノ酸番号1~269で示されるアミノ酸配列を含むことからなり、ホスホリパーゼ活性を有するポリペプチド、(15) (10)乃至(12)のいずれか1つに記載の宿主細胞を、ホスホリパーゼの産生可能な条件下で培養し、次いで、該培養物からホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドを回収することを特徴とする、該ポリペプチドの製造方法、に関するものである。

【0007】本発明者らは、麹菌アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) からホスホリパーゼA1 (以下「PLA1」という) をコードする遺伝子をクローニングし、さらに該遺伝子を培養細胞、酵母および麹菌に導入して発現させることに成功して、本発明を完成させた。

【0008】本発明において、「ホスホリパーゼ活性」とは、レシチンまたはリゾレシチンから、遊離脂肪酸を放出する活性をいう〔酵素ハンドブック (1982年版; 朝倉書店刊) p427参照〕。

【0009】また、本発明において、「組換えPLA1」とは、遺伝子操作によって得られ、配列表の配列番号2のアミノ酸番号1~269で示されるアミノ酸配列、または配列表の配列番号2のアミノ酸番号1~269で示されるアミノ酸配列中の1つもしくは2つ以上の部位において、1つもしくは2つ以上のアミノ酸が置換、欠失または挿入されているアミノ酸配列を含むことからなり、ホスホリパーゼ活性を有するポリペプチドをいう。本発明の組換えPLA1として特に好適なものとしては、配列表の配列番号2のアミノ酸番号1~269で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを挙げることができる。

【0010】さらに、本発明のDNAとしては、配列表の配列番号2のアミノ酸番号1~269で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAが好適である。より好適には、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号1~885で示されるヌクレオチド配列を有するDNAを挙げることができるが、これに限定されない。

【0011】

【発明の実施の形態】 本発明のDNAは、例えば、PLA1ポリペプチドを産生する微生物からPLA1ポリ

50

ペプチドをコードするmRNAを調製した後、既知の方法により該mRNAを二本鎖DNAに変換することによって得ることができる。前記mRNAの供給源となり得る微生物としては、本発明においては、麹菌アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) が好適であり、さらに *Aspergillus oryzae* (Ahlburg) Cohn SANK 11870 (FERM BP-3887) 株が好適である。

【0012】 mRNAの抽出にあたっては、グアニジン・チオシアネート・ホット・フェノール法、グアニジン・チオシアネート・グアニジン・塩酸法等も採用し得るが、グアニジン・チオシアネート・塩化セシウム法が好適である。

【0013】 上記のごとくして得られたmRNAがPLA1ポリペプチドをコードするものであることを確認するためには、mRNAを翻訳させ生理活性を調べるか、該タンパク質に特異的な抗体を用いてそのタンパク質を同定する方法を用いることができる。例えば、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の卵母細胞にmRNAを注入して翻訳させたり [Gurdon, J. B., et al. (1972) *Nature* 233, 177-182参照]、あるいはウサギ網状赤血球系や小麦胚芽系を利用した翻訳反応が行われている [Schleif, R. F. and Wensink, P. C. (1981) "Practical Methods in Molecular Biology" Springer Verlag, NY 参照]。

【0014】 前述のごとき方法で得たmRNAを鋳型として逆転写酵素を用いて一本鎖DNAを合成した後、この一本鎖DNAから二本鎖DNAを合成するが、その方法としてはS1ヌクレアーゼ法 [Efstratiadis, A., et al. (1976) *Cell* 7, 279-288 参照]、ランド法 [Land, H., et al. (1981) *Nucleic Acids Res.* 9, 2251-2266 参照]、O. Joon Yoo 法 [Yoo, O. J., et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 1049-1053参照] 等も採用し得るが、本発明の目的にはオカヤマーバーグ法 [Okayama, H. and Berg, P. (1982) *Mol. Cell. Biol.* 2, 161-170 参照] が好適である。

【0015】 次に、得られた組換えプラスミドを大腸菌等の微生物に導入して形質転換させて、テトラサイクリン耐性あるいはアンピシリン耐性を指標として組換え体を選択することができる。宿主細胞の形質転換は、ハナハンの方法 [Hanahan, D. (1983) *J. Mol. Biol.* 166, 557-580 参照]、すなわち塩化カルシウムや塩化マグネシウムまたは塩化ルビジウムを共存させて調製したコンピテント細胞に該組換えDNAを加える方法により実施することができる。なお、ベクターとしてはプラスミド以外にもラムダ系などのファージベクターも用いることができる。

【0016】 本発明により得られる形質転換体から、目的のPLA1ポリペプチドをコードするDNAを有する株を調定する方法としては、例えば以下に示す各種方法を用いることができる。

【0017】 【1】 合成オリゴヌクレオチドプローブを用いるスクリーニング法

目的とするタンパク質のアミノ酸配列の全部または一部が解明された場合 (該配列は、複数個連続した特異的配列であれば、目的とするタンパク質のどの領域のもでもよい)、該アミノ酸配列に対応するオリゴヌクレオチドを合成し (この場合コドン使用頻度を用いて導いたヌクレオチド配列または考えられるヌクレオチド配列を組み合わせた複数のヌクレオチド配列のどちらでもよく、また後者の場合、イノシンを含ませてその種類を減らすこともできる)、これをプローブ (^{32}P 等の放射性同位元素、ビオチン、ジゴキシゲニン等で標識する) として、ニトロセルロースフィルターあるいはナイロンフィルター上に固定された形質転換株のDNAとハイブリダイズさせ、プローブの標識法に応じた方法でポジティブ株を検索して、これを選択する。

【0018】 【2】 ポリメラーゼ連鎖反応により作成したプローブを用いるスクリーニング法

目的とするタンパク質のアミノ酸配列の全部または一部が解明されている場合、該アミノ酸配列の一部に対応するセンスストランドとアンチセンスストランドのオリゴヌクレオチドを合成し、これらを組み合わせてポリメラーゼ連鎖反応 [Saiki, R. K., et al. (1988) *Science* 239, 487-491参照] を行い、目的のPLA1ポリペプチドをコードするDNA断片を増幅する。ここで用いる鋳型DNAとしては、PLA1ポリペプチドを産生する細胞のmRNAより逆転写反応により合成されたcDNA、またはゲノムDNAを用いることができる。このようにして調製したDNA断片を上記【1】のごとく標識し、これをプローブとして用いてコロニーハイブリダイゼーションまたはブラークハイブリダイゼーションを行うことにより目的のクローンを選択する。

【0019】 【3】 PLA1ポリペプチドに対する抗体を用いて選択する方法

予め、cDNAを発現ベクターに組み込み、形質転換株内でタンパク質を産生させ、PLA1ポリペプチドに対する抗体および該抗体に対する二次抗体を用いて、所望のPLA1ポリペプチド産生株を検出し、目的の株を選択する。

【0020】 【4】 セレクティブ・ハイブリダイゼーション・トランスレーションの系を用いる方法

形質転換株から得られるcDNAを、ニトロセルロースフィルター等にプロットし、PLA1ポリペプチド産生細胞からのmRNAをハイブリダイズさせた後、cDNAに結合したmRNAを解離させ、回収する。回収されたmRNAをタンパク質翻訳系、例えばアフリカツメガエルの卵母細胞への注入や、ウサギ網状赤血球ライゼートや小麦胚芽等の無細胞系でタンパク質に翻訳させ、そのタンパク質のPLA1活性を調べるか、またはPLA1ポリペプチドに対する抗体を用いて検出して、目的の

群を識別する。

【0021】以上記載したmRNAを材料としてcDNAを複製する方法の他に、一般にある酵素をコードするDNA断片の調製は、その酵素に対応したヌクレオチド配列を含むDNAを供与体細胞から取り出し、制限酵素等で処理することにより行うことができる。

【0022】すなわち、本発明の細菌アスベルギルス・オリゼのPLA1ポリペプチドをコードするDNAを採取する方法は、公知の方法[Maniatis, T., et al. (1982) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY参照]に従い実施できる。例えば、細胞よりプラスミドDNAに相当する画分を分離し、該プラスミドDNAより該ポリペプチドをコードするDNA領域を切り出すことにより行い得る。

【0023】一般に、真核生物の遺伝子は、インターフェロン遺伝子等で知られているように、多型現象(poly morphism)を示すと考えられ[例えば、Nishi, T., et al. (1985) J. Biochem. 97, 153-159参照]、この多型現象によって1個またはそれ以上のアミノ酸が置換される場合もあれば、ヌクレオチド配列の変化はあってもアミノ酸は全く変わらない場合もある。配列表の配列番号2で示されるアミノ酸番号1~269からなるPLA1ポリペプチドのアミノ酸配列の中の、一つもしくは二つ以上の部位において、一つもしくは二つ以上のアミノ酸残基が欠失、挿入もしくは置換されているタンパク質でも、PLA1活性を有することがある。本発明においては、これらのタンパク質をPLA1の同効物と呼ぶ。

【0024】例えばインターロイキン2(IL-2)遺伝子のシステインに相当するヌクレオチド配列をセリンに相当するヌクレオチド配列に変換して得られたタンパク質がIL-2活性を保持することも既に公知となっている[Wang, A., et al. (1984) Science 224, 1431-1433参照]。それゆえ、それら天然に存在するかあるいは人工合成されたタンパク質がPLA1活性を有する限り、それらのタンパク質をコードする、同効のヌクレオチド配列からなるDNAもすべて本発明に含まれる。

【0025】このような各種の本発明のDNAは、上記PLA1ポリペプチドの情報に基づいて、例えばホスファイト・トリエステル法[Hunkapiller, M., et al. (1984) Nature 310, 105-111参照]等の常法に従い、核酸の化学合成により製造することもできる。

【0026】なお、所望のアミノ酸配列に対するコドンはその自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる[Grantham, R., et al. (1981) Nucleic Acid Res. 9, r43-r74参照]。さらに、これらヌクレオチド配列、コドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを用いたサイトスペシフィック・ミュータジェネシス(site specific mutagenesis)[Mark, D.F., et al.

1. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5662-5666参照]等に従うことができる。

【0027】また、あるDNAが本発明の(3)のDNAとハイブリダイズするか否かは、以下のようにして調べることができる。すなわち、まず被検検体のDNAを必要に応じてアガロースゲル電気泳動した後、ニトロセルロースまたはナイロン等の膜にプロットし、吸着したDNAを熱処理や紫外線照射等により膜に固定する。本発明の(3)のDNAを、ランダムプライマー法[Feinberg, A. P., et al. (1983) Anal. Biochem., 132, 6-13参照]、ニックトランスレーション法[Maniatis, T., et al. (1982) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, New York参照]等に従って、 ^{32}P 等の放射性同位元素、ビオチン、ジギキニンまたは酵素等で標識したプローブを作製する。該プローブを含むハイブリダイゼーション溶液中に膜を浸して、所定の温度でインキュベーションした後、膜を洗浄し、それぞれの標識に即した方法によりプローブを検出する。

【0028】ハイブリダイゼーション溶液中に含まれるSSC(saline-sodium citrate:「クエン酸ナトリウム-生理食塩液」; $1\times\text{SSC}$ は 0.15M の塩化ナトリウム、 15mM のクエン酸ナトリウムを含む)の濃度は好適には4乃至 $8\times\text{SSC}$ である。また、インキュベーション温度は好適には 30 乃至 70°C である。本発明においては、上記の範囲のSSC濃度およびインキュベーション温度の組み合わせを「ストリンジェントな条件」という。そのような条件としては、特に $6\times\text{SSC}$ 、 60°C の条件が最も好適である。

【0029】上記の方法を利用することにより、本発明の(3)のDNAとハイブリダイズするDNAを、種々のcDNAライブラリーまたはゲノムライブラリーからクローニングすることができる。

【0030】このようにして得られる本発明のDNAのヌクレオチド配列決定は、例えばマキサム・ギルバートの化学修飾法[Maxam, A. M. and Gilbert, W. (1980) Methods in Enzymology 65, 499-559参照]や、M13ファージを用いるジデオキシヌクレオチド鎖終結法[Messing, J. and Vieira J. (1982) Gene 19, 269-276参照]等により行うことができる。

【0031】クローン化されたPLA1ポリペプチドをコードする遺伝子を含む断片は、適当なベクターDNAに再び組み込むことにより、他の原核生物または真核生物の宿主細胞を形質転換させることができる。さらに、これらのベクターに適当なプロモーターおよび形質発現にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において遺伝子を発現させることが可能である。

【0032】原核細胞の宿主としては、例えばストレプトミセス・リビダンス(*Streptomyces lividans*)、大腸菌(*Escherichia coli*)や枯草菌(*Bacillus subtilis*)

(6)

特開平10-155493

9

10

8)等が挙げられる。目的の遺伝子をこれらの宿主細胞内に形質発現させるには、宿主と適合し得る種由来のレプリコン、すなわち複製起点および調節配列を含んでいるプラスミドベクターで宿主細胞を形質転換させればよい。またベクターは形質転換細胞に表現形質(表現型)の選択性を付与し得る配列を有するものが好ましい。

【0033】ベクターとしては一般にpBR322やpUC系等のプラスミドがよく用いられるが、これに限定されず、公知の各種の菌株およびベクターがいずれも利用できる。プロモーターとしては、大腸菌においてはトリプトファン(trp)プロモーター、ラクトース(lac)プロモーター、トリプトファン・ラクトース(tac)プロモーター、リボプロテイン(lpp)プロモーター、バクテリオファージ由来のラムダ(λ)P_Lプロモーター、ポリペプチド鎖伸長因子Tu(tufB)プロモーター等が挙げられる。

【0034】また真核微生物としては酵母やアスペルギルス・オリゼが一般によく用いられ、その中でもサッカロミセス属酵母、例えばサッカロミセス・セレビジエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、またはアスペルギルス・オリゼが好ましい。該酵母等の真核微生物の発現ベクターの調製に際しては、例えばアルコール脱水素酵素遺伝子のプロモーター[Bennetzen, J. L. and Hall, B. D. (1982) J. Biol. Chem. 257, 3018-3025 参照]や酸性ホスファターゼ遺伝子のプロモーター[Miyazawa, A., et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1-5参照]等を好ましく利用できる。またアスペルギルス・オリゼ用の発現ベクターとしては、pTAex3[Fujii, T., et al. (1995) Biosci. Biotech. Biochem. 59, 1869-1874参照]が好適である。

【0035】このようにして得られる本発明の形質転換細胞としては、サッカロミセス・セレビジエ KS58-2D/pCY339株またはアスペルギルス・オリゼ M-2-3/pAAP株が好適である。

【0036】上記で得られる所望の形質転換細胞は、常法に従い培養することができ、該培養により細胞内または細胞外に組換えPLA1ポリペプチドが生産される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択できる。

【0037】例えば、大腸菌を宿主として用いる場合、培地としてはLB培地、2×YT培地、L培地、肉汁培地、M9最小培地等、当業者に周知のものをいずれも使用することができる。また、培養温度は好ましくは15乃至40℃であり、より好適には25乃至37℃である。培養に要する時間は、嫌気性または好気性条件下で通常10日間以内、好適には8時間乃至3日間である。

【0038】また、酵母を宿主として用いる場合、培地としてはYPD培地、MY培地、麦芽エキス培地、合成最小培地等、当業者に周知のものをいずれも使用することができる。また、培養温度は好ましくは15乃至40

℃であり、より好適には20乃至30℃である。培養に要する時間は、嫌気性または好気性条件下で通常20日間以内、好適には3乃至7日間である。

【0039】さらに、COS-1細胞を宿主として用いる場合、培地としては最小必須培地(MEM)、ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)、ハムのF12培地、RPMI1640培地等が使用され得る。培養温度は好ましくは30乃至37℃であり、最も好適には37℃である。また、培養機内の空気の炭酸ガス濃度は5乃至10%、最も好適には5%に調節されていることが望ましい。

【0040】その他、使用する宿主細胞に応じて、該宿主細胞の生育および蛋白質生産が可能な培地および培養条件を用いることができる。

【0041】上記方法により、形質転換体の細胞内または細胞外に生産されるPLA1ポリペプチドは、該PLA1ポリペプチドの物理学的性質や化学的性質等を利用した各種の公知の分離操作法により、それらより分離・精製することができる。該方法としては、具体的には例えば通常のタンパク質沈殿剤による処理、限外濾過、分子ふるいクロマトグラフィー(ゲル濾過)、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等の各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組み合わせ等を例示できる。

【0042】本発明により得られる組換えPLA1ポリペプチドがホスホリパーゼ活性を有するか否かは、例えば以下に記載する方法で確認することができる。

【0043】(1)レシチンを基質として、遊離脂肪酸を定量する方法[特開平6-62850参照]；

(2)1-[1-¹⁴C]オレオイルグリセロールまたは1-[1-¹⁴C]パルミトイル-2-アシル-sn-グリセロール-3-ホスホエタノールアミンを基質とし、遊離脂肪酸の放射能を測定する方法[Waitt, M., et al. (1974) J. Biol. Chem. 249, 6401-6405参照]。

【0044】上記方法により、容易に高収率、高純度で所望の組換えPLA1ポリペプチドを工業的規模で製造できる。このようにして得られる本発明の組換えPLA1ポリペプチドの諸性質は既に文献に記載された天然のPLA1[特開平6-62850参照]の諸性質と共通しており、その生物活性により、食品工業、飼料工業、医薬品工業当の分野で主としてリゾリン脂質生産のために幅広く使用され得る。

【0045】本発明の組換えPLA1は、優れた活性および選択性を有し、大量かつ安価に定常的に供給可能な、極めて有用なホスホリパーゼである。本酵素を用いてリン脂質を分解させる酵素反応は、酵素と基質を、水性溶液中または湿潤状態で接触させることにより行われる。使用される基質は、例えば、小麦粉、大豆、卵黄等のレシチンであり、その濃度は、好適には、1乃至50

(7)

特開平10-155493

11

12

量である。使用する水は、井戸水または水道水がそのまゝ使用できるが、より効率的な酵素反応のために、 pH （例えば酢酸）、アルカリ（例えば水酸化ナトリウム）あるいは緩衝液（例えば酢酸緩衝液）を加えて、 pH を3乃至7（特に好適には、3.5乃至5.5）に調整して用いることもできる。反応温度は、10℃乃至70℃（好適には20℃乃至65℃、特に好適には30℃乃至60℃）であり、反応に要する時間は、基質、反応温度、 pH 等により異なるが、通常10分間乃至10日間（好適には、1時間乃至2日間）である。

【0046】酵素反応終了後、得られたリゾリン脂質は、分離することなく直接加工処理に使用できる。また、常法により不溶物を分別し、直接使用するか、濃縮により適量リゾリン脂質を得ることもできる。さらに、必要に応じて、水を加えて、水不混和性有機溶剤で抽出し、抽出溶剤を留去することにより得ることもできる。また、必要に応じて、常法、例えば、カラムクロマトグラフィー、再結晶法等によりさらに精製することもできる。

【0047】

【実施例】 以下に実施例を挙げ、本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0048】実施例1. PLA1の部分アミノ酸配列の決定

PLA1は、*Aspergillus oryzae* (Ahlburg) Cohn SANK 11870 (FERM. BP-3887) 株（以下「SANK 11870株」という）から、服部らの方法〔特開平6-62580参照〕により精製した。ドデシル硫酸ナトリウム（以下「SDS」という）存在下でのポリアクリルアミドゲル電気泳動により算出した分子量が37000に相当するPLA1a (0.1mg/ml) の20mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5) 0.45mlに、0.4% (w/v) デオキシコール酸（シグマ社製）を含むトリクロロ酢酸45 μ lを添加し、10000rpm、4℃で10分間遠心分離した。沈澱に対して0.68mlの冷却アセトンを添加し、10000rpm、4℃で10分間遠心分離し、沈澱を減圧乾燥した。この沈澱を、トリス・グアニジン溶液〔6M 塩酸グアニジンを含む0.5M トリス・塩酸緩衝液 (pH8.5)〕90 μ lに溶解し、窒素ガスを1分間吹き込んだ。これに、100mM ジチオスレイトールを含むトリス・グアニジン溶液4.5 μ lを添加し、再び窒素ガスを2分間吹き込んだ。室温で2時間静置後、100mM ヨードアセトアミド溶液を9 μ l添加し、室温で30分間静置した。この溶液を、蒸留水に対して、4℃で一晩透析し、減圧乾燥した。これに8M 尿素を30 μ l添加し、37℃で1時間保温した。これにダイジェスション緩衝液（CTFDキット、島津製作所（株）社製）を43 μ l添加し、さらに10mg/mlのリシルエンドペプチダーゼを13 μ l添加して、37℃で一晩

保温した。

【0049】次いで、この反応液に0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸を0.3ml添加し、その全量を逆相HPLCで分画した。HPLCの条件は以下の通りであった。

【0050】カラム：コスモシール5C8-AR-300（サイズ4.6 \times 10mm、ナカライテスク社製）；流速：0.5ml/分；

移動相：0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸を用い、アセトニトリルの濃度を初期濃度5% (v/v)、最終濃度80% (v/v) とし、15分間のグラジエントをかけて溶出；

検出波長：210nm。

【0051】上記の条件で溶出時間5.2分、6.8分、8.0分、9.2分および9.8分のピークを分画し、各ピークについて、気相式プロテインシーケンサ（モデルPPSQ-10；島津製作所（株）社製）を用いて、自動エドマン法〔Edman, P., et al. (1967) Eur. J. Biochem. 1, 80 参照〕によりアミノ酸配列を解析した。上記各ピークのアミノ酸配列は以下に記載する通りであった：

溶出時間 (分)	配列
5.2	配列表の配列番号3
6.8	配列表の配列番号4
8.0	配列表の配列番号5
9.2	配列表の配列番号6
9.8	配列表の配列番号7。

【0052】実施例2. アスベルギルス・オリゼのmRNAの調製

SANK 11870株を培地（1% (w/v) ホリベアトン（日本製薬（株）社製）、5% (w/v) ショ糖、0.5% (w/v) イーストエキストラクト（ディフコ社製）、0.1% (w/v) 硫酸マグネシウム・7水和物、0.5% (w/v) 炭酸カルシウム、0.8% (w/v) Tween 80（第一化学薬品（株）社製）、0.5% (w/v) グルタミン酸ナトリウム、1% (w/v) レシチン（豊年（株）社製）、0.25% (w/v) リン酸水素二カリウム・0.25% (w/v) リン酸二水素カリウム緩衝液 (pH6.6)）100mlを含む500ml容三角フラスコに接種し、26℃、210rpmで培養した。3日間、5日間および7日間培養後の菌体を集菌し、直ちに液体窒素で凍結させてから、-80℃で保存した。

【0053】次に、予めドライアイス上で冷却した乳鉢中で、凍結保存菌体3gを粉状になるまで破碎した。これをグアニジシチオシアネート溶液（4M グアニジシチオシアネート（フルカ社製）、4% (w/v) ギャロシル（シグマ社製）、0.1% (w/v) アンチフォームA（シグマ社製）、20mM EDTA・2Na、4mM 2-メルカプトエタノールおよび25mMクエン

(8)

特開平10-155493

13

AC三ナトリウム (pH 7.0) 15mlで満たしておいた遠心管に移し、激しく攪拌後、ポリトロンホモジナイザーを用いて30秒間固体を破砕した。これを9000rpm、15分間、4℃で遠心分離し、上清を再び9000rpm、4℃で15分間遠心分離した。上清7mlを、予め3mlの0.1M EDTA・2Naを含む5.7M塩化セシウム溶液を入れておいた超遠心管 (1.3PA:日立(株)社製) に静かに重層し、30000rpm、4℃で15時間遠心した。遠心分離後、沈澱を0.3mlの1mM EDTA・2Naを含む10mM

トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) (以下「TE」という) に溶解した。これに30μlの3M 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.2)、および1mlのエタノールを添加した。これを14500rpm、4℃で10分間遠心分離し、沈澱に80% (v/v) エタノールを添加し、再び14500rpm、4℃で5分間遠心分離した。沈澱を減圧乾燥後、40μlのTEに溶解したものを全RNA試料とした。

【0054】このようにして得られた全RNAを、オリゴ(dT)セルロースカラムクロマトグラフィーを行うことにより、ポリ(A)+RNAを精製した。すなわち、全RNA (540μg) を吸着緩衝液 (0.5M 塩化ナトリウム、20mM トリス-塩酸 (pH 7.5)、1mM EDTA、0.1% (w/v) SDS) に溶解し、65℃で5分間加熱した後、吸着緩衝液にて充填されたオリゴ(dT)セルロースカラム (Type 7; ファルマシア社製) に供与し、溶出溶液 (10mM トリス-塩酸 (pH 7.5)、1mM EDTA、0.05% (w/v) SDS) でポリ(A)+RNAを溶出し、回収した。このような操作により、20μgのポリ(A)+RNAを得た。

【0055】実施例3. アスベルギルス・オリゼのcDNAライブラリーの調製

実施例2で得られたSANK 11870株のmRNA (3μg) を、5mMトリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) 15μlに溶解した。これを65℃、5分間加熱後、37℃まで冷却し、10倍濃度の逆転写酵素緩衝液 (80mM 塩化マグネシウム、300mM 塩化カリウム、3mM ジチオスレイトールを含むトリス-塩酸緩衝液 (pH 8.5)) 3μl、20mM dATP、20mM dCTP、20mM dGTPおよび20mM dTTPの混合溶液3μl、0.5μg/μlのベクタープライマー (pCDV1' オリゴ(dT) テイルド・プラスミド; ファルマシア社製) を3μl、27単位/μl 逆転写酵素 (トリ骨髄芽球症ウイルス (avian myeloblastosis virus) 由来; 生化学工業 (株) 社製) 1.7μl、蒸留水4.3μlを添加し、37℃で30分間保温した。

【0056】反応液に1/2容量のTE飽和フェノールおよび1/2容量のクロロホルムを加え、激しくよく混

14

ぜた後、10000rpmで5分間遠心分離した。水層を回収し、これに1/2容量のTE飽和フェノール、および1/2容量のクロロホルムを加え、激しくよく混ぜた後、10000rpmで5分間遠心分離した。再び水層を回収し、これに同量のクロロホルムを加え、激しくよく混ぜた後、10000rpmで1分間遠心分離し、水層を回収した (以下、この操作を「フェノール・クロロホルム抽出」という)。

【0057】回収した水層に、1/10容量の3M酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) および2.5倍量のエタノールを加え、-80℃で15分間冷却後、10000rpm、5分間遠心分離した。沈澱を80% (v/v) エタノールで洗浄後、減圧乾燥した (以下、この操作を「エタノール沈澱」という)。

【0058】この沈澱に13μlの蒸留水、2μlの10倍濃度のターミナルデオキシヌクレオチルトランスフェラーゼ反応用緩衝液 (1.4M カコシル酸ナトリウム、10mM 塩化コバルトを含む0.3M トリス-塩酸 (pH 7.6))、2μlのポリ(A)、1μlの2mM ジチオスレイトール、0.6μlの2mM dATP、2mM dCTP、2mM dGTPおよび2mM dTTPの混合溶液および21単位/μlのターミナルデオキシヌクレオチルトランスフェラーゼ (ファルマシア社製) を0.5μl加え、37℃で5分間保温した。反応液をフェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈澱した後、得られた沈澱を24μlのTEに溶解し、30単位の制限酵素HindIIIを加えて37℃で一晩保温した。反応液をフェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈澱した後、沈澱を10μlのTEに溶解したものを、アスベルギルス・オリゼcDNA試料とした。

【0059】一方、プラスミドベクターpCDL-SRα296 [武部ら、(1989) 実験医学 7巻、95-99参照] を制限酵素PstIで消化し、さらにその3'末端にターミナルデオキシヌクレオチルトランスフェラーゼ (ファルマシア社製) によりdGTPを付加させた。次いで、このものを制限酵素HindIIIで消化することにより、SRαプロモーターにオリゴ(dG)が付加されたオリゴ(dG)付きリンカーDNAを作製した。

【0060】上記アスベルギルス・オリゼcDNA試料1μlに、0.5μlの上記オリゴ(dG)付きリンカーDNA (0.08pmol相当)、2μlの5倍濃度ハイブリダイゼーション緩衝液 (5mM EDTA、50.0mM 塩化ナトリウムを含む50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5))、および6.5μlの蒸留水を加え、65℃で5分間加熱した後、43℃で30分間保温した。これに9μlの10倍濃度のライゲーション緩衝液 (アマシャム社製)、68μlの蒸留水および1μlの10mM β-ニコチンアミドアデニンジヌクレ

(9)

特開平10-155493

15

トナド(ペーリンガー・マンハイム社製)を加え、氷上で10分間冷却後、2 μ lの0.28 μ g/ μ lのDNAリガーゼ(ファルマシア社製)を添加し、12℃で一晩保温した。この反応液に、2mM dATP、2mM dCTP、2mM dGTPおよび2mM dTTPの混合溶液2 μ l、10mM β -ニコチンアミドアデニンジメクレオチド0.5 μ l、0.28 μ g/ μ lのDNAリガーゼ(大腸菌由来;ファルマシア社製)1.5 μ l、4単位/ μ lのDNAポリメラーゼI(ファルマシア社製)1 μ lおよび1単位/ μ lのリボヌクレアーゼH(ファルマシア社製)4 μ lを加え、12℃で1時間保温した。反応液をフェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈澱した後、沈澱を100 μ lの蒸留水に溶解した。

【0061】実施例4. アスベルギルス・オリゼの染色体DNAライブラリーの作製

実施例2に記載した方法により培養し、-80℃で凍結保存したSANK 11870株の菌体3gを、ドライアイスで冷却した乳鉢上で粉状になるまで破砕した。破砕した菌体を、あらかじめ20mlの62.5mM EDTA・2Na、5%(w/v) SDSを含む50mM トリス-塩酸緩衝液(pH8)で満たしておいた遠心管に移し、激しく攪拌後、氷上で1.5時間静置した。これにTE飽和フェノール10mlを加え、50℃で1時間、緩やかにふり混ぜた。その後さらにTE飽和フェノール5mlを加え、3000rpmで10分間遠心分離した。水層を別の遠心管に回収し、7.5mlのTE飽和フェノールおよび7.5mlのクロロホルムを加え、激しく攪拌後、3000rpmで10分間遠心分離した。再び水層を別の遠心管に回収し、1/2容量の8M 酢酸アンモニウム溶液と25mlのエタノールを加え、-80℃で15分間冷却後、10000rpm、4℃で10分間遠心分離した。沈澱を5mlのTEに溶解し、2mg/mlのリボヌクレアーゼAおよび2500単位/mlのリボヌクレアーゼT1を含む溶液を100 μ l添加し、37℃で20分間保温した。これに20mlのイソプロパノールを加え、緩やかに混合することにより、生じた糸状のDNAをピンセットで釣り上げ、0.8mlのTEに溶解した。

【0062】このDNA溶液に1/2容量のTE飽和フェノールと1/2容量のクロロホルムを加え、激しく攪拌後、15000rpmで5分間遠心分離し、水層を回収した。この操作をさらに3回繰り返して、得られた水層に等量のクロロホルムを加え、激しく攪拌後、15000rpmで5分間遠心分離し、水層を回収した。この水層に1/10容量の3M酢酸ナトリウム(pH6.5)および2.5容量のエタノールを加え、-80℃で15分間冷却後、15000rpmで5分間遠心分離し、沈澱を回収した。この沈澱に1mlの80%(v/v)エタノールを加えて、15000rpmで5分間遠

16

心分離し、沈澱を回収した。この沈澱を減圧乾燥し、TEに溶解したものを、精製アスベルギルス・オリゼ染色体DNAとした。

【0063】次いで、アスベルギルス・オリゼ染色体DNA(15 μ g相当)を、400単位の制限酵素Pst Iを用いて消化(37℃、12時間)した後、エタノール沈澱した。

【0064】一方、3 μ g相当のアラスミドpUC18(宝酒造(株)社製)を100単位の制限酵素Pst Iで消化し、エタノール沈澱した。沈澱を200 μ lのTEに溶解し、2.5単位/ μ lのアルカリフォスファターゼ(CAP-101;東洋紡(株)社製)を1 μ l添加して、37℃で30分間保温した後、フェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈澱した。

【0065】制限酵素Pst Iで消化したアスベルギルス・オリゼ染色体DNA(500ng相当)と、同じくPst I消化したpUC18とを、DNAライゲーションキット(宝酒造(株)社製)を用いて連結した。この反応液で大腸菌JM109を形質転換[Hanahan, D. (1983) J. Mol. Biol. 166, 557-580 参照]することにより、アスベルギルス・オリゼの染色体DNAライブラリーを調製した。

【0066】実施例5. PCR法によるPLA1遺伝子のクローニング

PLA1の部分アミノ酸配列:

Asp Leu Phe Ala Gln Tyr (配列表の配列番号6のアミノ酸番号11~16)

をコードする17merの混合センスプライマー:

5'-GA(CT)(TC)T(ACGT)TT(CT)G CICA(AG)TA -3' (配列表の配列番号8;なお配列中、括弧で囲まれた部分は、該括弧内のヌクレオチドのうちの任意の1ヌクレオチドを表わす)

を固相ホスホアミダイト法[Beaucage, et al. (1981) Tetrahedron Letters 22, 1859-1862 参照]により化学合成した。

【0067】また、PLA1の別の部分アミノ酸配列: Asp Glu Phe Asn Glu Ser (配列表の配列番号5のアミノ酸番号20~25)

をコードする16merの混合アンチセンスプライマー:

5'-(GC)(AT)TC(AG)TT(AG)AA (CT)TC(AG)TC -3' (配列表の配列番号9)

を化学合成した。プライマーの合成はDNAシンセサイザー(モデル380A;アプライドバイオシステム社製)を用いて行なった。

【0068】実施例3で調製したアスベルギルス・オリゼのcDNAライブラリーを鋳型として、上記混合センスプライマー925ng、混合アンチセンスプライマー925ng、0.2mM dATP、0.2mM dCTP、0.2mM dGTP、0.2mM dTTP、

(10)

特開平10-155493

17

30 mM 塩化カリウム、1.5 mM 塩化マグネシウムおよび2.5単位のTaq DNAポリメラーゼを含む10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.3) 0.1 ml 中で、1 サイクルあたり94℃で1分、50℃で1分、72℃で2分の条件で、30 サイクルのPCRを実施した。

【0069】PCRにより得られた反応生成物から0.14 kbp の断片を切り出し、DNAブランチングキット (宝酒造 (株) 社製) を用いて末端を平滑化後、DNAライゲーションキット (宝酒造 (株) 社製) を用いて、プラスミドpUC18 (宝酒造 (株) 社製) のSma I 切断部位に挿入することにより、プラスミドpRAV12を構築した。

【0070】pRAV12に挿入された0.14 kbp 断片のヌクレオチド配列の解析は、ダイデオキシ法により行なった。すなわち、プラスミドpRAV12をチャングロの方法 [Zhang, H., et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16, 1220参照] でアルカリ変性し、鋳型DNAを調製した後、7-デアザシーケエネースバージョン2.0キット (東洋紡 (株) 社製) を用いてヌクレオチド配列を解析した。また、該キットのDNAポリメラーゼ反応用プライマーDNAとしては、M13プライマーM4 (宝酒造 (株) 社製) あるいはM13プライマーRV (宝酒造 (株) 社製) を用いた。

【0071】その結果、pRAV12中の0.14 kbp のDNA断片は、

Ser Ala Ala Tyr Cys Asp Glu Asn Leu、および
Ser Val Gly Asn Cys Pro Leu Val Glu Ala Ala Ser Thr
Gln Ser Leu

のミノ酸配列をコードするオープンリーディングフレームを含んでいた。上記配列は実施例1で決定されたPLA1の部分ミノ酸配列 (配列表の配列番号6および配列番号5; 解析不能であるシステインを除く) の一部と一致していたので、このDNA断片はPLA1遺伝子をコードしていることが確かめられた。

【0072】実施例6. コロニーハイブリダイゼーション

実施例4で作製したアスペルギルス・オリゼの染色体DNAライブラリーを含む大腸菌JM109株を、TY培地 (10 g/リットルのバクト・トリプトン (ディフコ社製)、5 g/リットルのイーストエキストラクト (ディフコ社製)、1.5% (w/v) 寒天末および100 μg/ml アンピシリン) を入れた培養プレート (直径9 cm) 1枚あたり約2000コロニーとなるように播種した。37℃で一晩培養後、円形のニトロセルロースフィルター (HA; 孔径0.45 μm、直径82 mm; ミリボア社製) を培地に載せることにより、プレート中の大腸菌コロニーを移した。このフィルターを、新しいTY培地に置いて、37℃で一晩培養した。

【0073】大腸菌のコロニーが生育したニトロセルロ

18

ースフィルターを、0.5 M の水酸化ナトリウムを染み込ませたろ紙 (No. 2: アドバンテック (株) 社製) に載せ、室温で5分間静置することにより大腸菌を溶菌した。次いで、フィルターを1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8) を染み込ませたろ紙上に置き、室温で5分間静置した。さらに、フィルターを1.5 M 塩化ナトリウムを含む1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8) を染み込ませたろ紙上に載せ、室温で5分間静置後、2×SSC溶液 (0.3 M 塩化ナトリウムを含む0.03 M クエン酸三ナトリウム二水和物溶液) を染み込ませたろ紙上に載せ、室温で5分間静置した。フィルターを風乾後、80℃で2時間加熱してから、6×SSC (0.9 M 塩化ナトリウムを含む0.09 M クエン酸三ナトリウム二水和物溶液) 中で十分に洗浄し、風乾した。

【0074】プローブの標識は、以下に記載する方法により行なった。まず20 μg のpRAV12を200単位のEcoRIで消化した (37℃、12時間)。これを6% (w/v) ポリアクリルアミドゲルを用いて1×TBE緩衝液 (1 mM のEDTA・2Naを含む50 mM トリス-ほう酸緩衝液 (pH 8.3) 中、100 V で電気泳動した後、0.14 kbp に相当するバンドのDNA断片を切り出した。この0.14 kbp のDNA断片をニックトランスレーションキット (アマシャム社製) および[α-³²P]-dCTPを用いて標識した。未反応の[α-³²P]-dCTPは、ニックカラム (ファルマシア社製) を用いて除去した。

【0075】ハイブリダイゼーションは、以下の方法により行なった。すなわち、風乾したニトロセルロースフィルターをハイブリダイゼーション溶液 (40% (v/v) ホルムアミド、5×SSC (0.15 M 塩化ナトリウム、0.015 M クエン酸三ナトリウム)、5×デンハルト溶液 (ウシ血清アルブミン (シグマ社製) 1 g/リットル、フィコール400 (ファルマシア社製) 1 g/リットル、ポリビニルピロリドン (シグマ社製) 1 g/リットル)、0.5% (w/v) SDSおよび100 μg/ml のサケ精子DNAを含む10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)) に浸し、42℃で2時間保温した。その後、上記のごとく標識したプローブを添加し、同じハイブリダイゼーション溶液中で42℃で一晩保温した。その後、フィルターを40% (v/v) ホルムアミドおよび5×SSCを含む0.1% (w/v) SDS溶液に移し、42℃で30分間洗浄した。さらにフィルターを2×SSC中で42℃、1時間洗浄した後風乾し、オートラジオグラフィーを行なった。

【0076】上記の方法で約52500個のコロニーをスクリーニングし、3個の陽性クローンを選択した。これらの陽性クローンから調製したプラスミドをそれぞれ制限酵素PstIで消化することによりpUC18由来の2.7 kbp 相当のバンドの他に4.3 kbp 相当のバンドを生じたクローンを選択し、該クローンが保持す

50

(11)

特開平10-155493

19

るプラスミドをpRAV43と命名した。

【0077】実施例7. PLA1をコードするcDNAのクローニング

pRAV43に含まれるPLA1ゲノムDNAのヌクレオチド配列の解析は、ジデオキシ法とDNAシーケンサーを用いることにより実施した。ジデオキシ法の場合、pRAV43を前記チャングらの方法によりアルカリ変性させることにより鋳型DNAを調製した。配列の決定は7-デアザシーケンエースバージョン2.0キットを用いて行った。

【0078】また、DNAシーケンサーを用いる場合は、ダイターミネーターサイクルシーケンシングキット（パーキンエルマー・ジャパン社製）を使用して試料を調製し、DNAシーケンサーモデル373A（パーキンエルマー・ジャパン社製）でヌクレオチド配列を決定した。

【0079】以上のごとくして決定されたPLA1のゲノムDNAのヌクレオチド配列より、該DNA中には3つのイントロンの存在が予想された。また、PLA1ゲノム遺伝子の塩基配列の中で、PLA1のN末端アミノ酸およびC末端アミノ酸をコードする位置を推定してプライマーを設計した。すなわち、以下に記載する配列のヌクレオチドプライマー：

5'- CGTCCTGCAC GGCATTCAAA -3'（センスプライマー：配列表の配列番号10）

および、

5'- TCCCTTCTCA AAGCCAGAAT -3'（アンチセンスプライマー：配列表の配列番号11）

を合成した。

【0080】次いで、実施例3で作製したアスペルギルス・オリゼのcDNAライブラリー1μgを、20単位の制限酵素Pst Iを用いて消化した（37℃、2時間）。このPst I処理したcDNAライブラリー5ngを、センスプライマー200nM、アンチセンスプライマー200nM、0.2mM dATP、0.2mM dCTP、0.2mM dGTP、0.2mM dTTP、10mM 塩化カリウム、6mM 硫酸アンモニウム、2mM 塩化マグネシウム、0.1%（w/v）トライトンX-100、0.01mg/ml ウシ血清アルブミン、Pfu DNAポリメラーゼ（ストラタジーン社製）5単位を含む20mM トリス-塩酸緩衝液（pH8.0）50μlに溶解し、1サイクルあたり94℃で30秒、55℃で30秒、72℃で1分の条件で、30サイクルのPCRを実施した。PCR後の反応液をフェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈澱して、沈澱をTEに溶解した。

【0081】このPCR反応生成物（20μg相当）

に、10mM 塩化マグネシウム、1mM ATP、T4ポリヌクレオチドキナーゼ（宝酒造（株）社製）100単位、および5mM ジチオスレイトールを含む50

20

mM トリス-塩酸緩衝液（pH7.5）400μlを加え、37℃で30分間保温した。反応液をフェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈澱を行って、沈澱をTEに溶解した。

【0082】一方、10μgのpUC18を100単位のSma Iで消化した（25℃、3時間）後、反応液をフェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈澱を行って、沈澱を200μlのTEに溶解した。これにアルカリフォスファターゼ（東洋紡（株）社製）を5単位添加し、37℃で30分間保温した後、フェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈澱を行って、沈澱をTEに溶解した。

【0083】上記のごとくして得られたSma I消化pUC18（100ng相当）と、リン酸化したPCR反応生成物（50ng相当）とを、DNAライゲーションキット（宝酒造（株）社製）を用いて連結し、プラスミドpRAV885を構築した。

【0084】pRAV885に含まれる、PLA1をコードするcDNAのヌクレオチド配列は、ダイターミネーターサイクルシーケンシングキットおよびDNAシーケンサーを用いて決定した。このヌクレオチド配列（配列表の配列番号1）と前記PLA1ゲノムDNAのヌクレオチド配列との比較により、ゲノム上のイントロンの位置を決定した。

【0085】実施例8. 動物細胞用発現ベクターの構築

10μgのpRAV885を100単位の制限酵素Sac Iで消化した（37℃、3時間）後、フェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈澱した。このDNAの切断末端を、DNAブランディングキット（宝酒造（株）社製）を用いて平滑化した後、反応液をフェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈澱を行って、沈澱を0.4mlのTEに溶解した。これに5単位のアルカリフォスファターゼ（東洋紡（株）社製）を添加し、37℃で30分間保温した後、フェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈澱した。このDNAに、0.5μgのPst Iリンカー（宝酒造（株）社製）を添加し、DNAライゲーションキット（宝酒造（株）社製）を用いて閉環することにより、pRAV885のSac I切断配列をPst I切断配列に置換したプラスミドpRAV820を構築した。

【0086】次に、pRAV820を制限酵素Sal IとPst Iで消化し、cDNAインサートを含む約1.0kbpの断片を単離、精製した。

【0087】一方、高発現ベクターpME18S [Hara, T., et al. (1992) EMBO J. 11,1875参照]を制限酵素Xho IおよびPst Iで消化した後、T4DNAリガーゼを用いた反応により、上記のSal I-Pst I消化したDNA断片と連結した。このDNAで大腸菌を形質転換し、得られた形質転換株からそれぞれプラスミ

(12)

特開平10-155493

21

トDNAを抽出した。これらの形質転換株のうち、プラスミドDNAを制限酵素EcoRIで消化することにより0.3kbpおよび3.6kbpの断片を生じ、かつ制限酵素XbaI消化により0.9kbpおよび3.0kbpの断片を生じるようなクローンを選択し、該クローンが保持するプラスミドをpRAV825と命名した。

【0088】実施例9. COS-1細胞におけるPLA1遺伝子の発現
COS-1細胞のトランスフェクションは、遺伝子導入装置（モデルGTE-1；島津製作所（株）社製）を用いて、電気穿孔法により行った。まずCOS-1細胞を、細胞培養フラスコ中、血清を含まないダルベッコ改良イーグル培地（以下「DMEM」という）でセミコンフルエントになるまで増殖させてから、トリプシン-EDTA処理により細胞を剥がして回収し、PBS（-）緩衝液（宝酒造（株）社製）で2回洗浄した後、PBS（-）緩衝液で 6×10^7 細胞/mlとなるように懸濁した。

【0089】一方、DNA精製キット（ウィザード・マキシプレップス・DNAピュリフィケーションシステム；プロメガ社製）で調製したpRAV825およびpME18Sを、PBS（-）緩衝液でそれぞれ200μg/mlに調整した。

【0090】上記細胞懸濁液とDNA溶液を20μlづつ混合し、これを電極間隔2mmのチャンバーに入れ、600V-30secのパルスを1秒間隔で2回与えた。チャンバーを4℃で5分間冷却した後、チャンバー中の細胞・DNA混合液を10%ウシ胎児血清を含むDMEM 10mlに加え、細胞培養用シャーレに移し

22

※て、37℃、5%炭酸ガス下で一晩培養した。その後、培養上清を除き、血清を含まないDMEMで細胞を洗浄し、DMEM 10mlを加えて3日間培養してから、培養上清を回収した。

【0091】試験例1

実施例9で調製したCOS-1細胞培養上清各2.5mlを、限外濾過膜付き遠心管（セントリコン-10；グレースジャパン社製）を用いて、5000rpm、4℃で1.5時間遠心分離することにより、それぞれ220μlまで濃縮し、以下に記載するホスホリパーゼ活性測定用の検体（以下「COS-1/pRAV825」および「COS-1/pME18S」という）として使用した。

【0092】2%（w/v）SLP-ホワイト（ツルレーシチン社製：SLP-ホワイト0.2gに4%（v/v）トライトンX-100 10mlを加え溶解させたもの）0.5mlに、0.1M 塩化カルシウム二水和物溶液0.05mlおよび0.2M 酢酸緩衝液（pH 4.0）0.25mlを加え、37℃で5分間予備加熱した後、検体0.1mlを添加し、37℃で10分間保温した。これに1N塩酸を0.1ml添加することにより反応を停止させた。反応停止後直ちに、反応液20μl中に含まれる遊離脂肪酸を遊離脂肪酸定量用の酵素キット（デタミナー：協和メディクス（株）社製）を用いて定量した。なお、1分間に遊離脂肪酸1μmoleを生成する酵素活性を1単位とした。

【0093】上記の方法で測定した各検体のホスホリパーゼ活性は表1に記載する通りであった。

【0094】

【表1】

検体	活性（単位/リットル）
COS-1/pRAV825	4.8×10^2
COS-1/pME18S	0.0

実施例10. 酵母用の発現ベクターの構築

酵母用発現ベクターの構築のための出発材料のプラスミドとしては、pCY303 [特開平5-17132参照]を用いた。PLA1を酵母の細胞外に分泌させるため、以下に記載する方法で酵母のカルボキシペプチダーゼY（以下「CPY」という）由来のプレ領域、プロ領域、およびCPY成熟体のN末端の2アミノ酸（リジン-イソロイシン）をコードするDNA [Valls, L. A., et al. (1987) Cell 48, 887-897参照]を、ポリメラーゼ連鎖反応（以下「PCR」という）[Saiki, R. K., et al. (1988) Science 239, 487-491参照]を用いて、PLA1成熟体をコードするDNAに連結することにより、酵母用のPLA1遺伝子発現プラスミドpCY303を構築した。具体的には、以下に記載する方法で行った※50

※た。

【0095】まず、以下に記載するヌクレオチド配列を有するプライマー：

5'-GGGTCGACAT GAAAGCATTC ACCAGTTT -3' (S1：配列表の配列番号12) および、

5'-AGAAGGGAG AGCTGACATC AATCTTGTG ACACGAAGCT -3' (A2：配列表の配列番号13)

を合成した。

【0096】次に、制限酵素HindIIIで消化したpCY303を5ng、センスプライマーS1を200nM、アンチセンスプライマーA2を200nM、0.2mM ATP、0.2mM dCTP、0.2mM dGTP、0.2mM dTTP、10mM 塩化カリウム、6mM 硫酸アンモニウム、2mM 塩化マグネ

(13)

特開平10-155493

23

シウム、0.1% (w/v) トライトンX-100、0.01mg/ml ウシ血清アルブミン、Pfu DNAポリメラーゼ(ストラタジーン社製)5単位を含む20mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.0)50μl中で、94℃で30秒、55℃で30秒、72℃で1分の条件で30サイクルのPCRを行なった後、さらに72℃で10分間保温した。

【0097】未反応のプライマーを除くため、PCR反応液を、1×TBE緩衝液中、100Vでアガロースゲル電気泳動し、0.37kbpに相当するバンド部分のゲルを切り出し、透析チューブ(排出限界分子量12000-14000:ギブコ・ビーアールエル社製)中に入れて、200Vで1時間溶出した。透析チューブ内液を、フェノール・クロロホルム処理し、エタノール沈澱した。沈澱を風乾後、TEに溶解した(以下、同様の操作を「切り出し」という)。

【0098】一方、以下に記載するヌクレオチド配列を有するプライマー:

5'-AGCTTCGTGT CAACAAGATT GATGTCAGCT CTTCCCTTCT-3' (S2:配列表の配列番号14)および、

5'-CCCAAGCTTC TATGAACATT CGCTAATAT -3' (A1:配列表の配列番号15)

を合成した。

【0099】次いで、制限酵素HindIIIで消化したpRAV885(5ng)を鋳型とし、センスプライマーS2を200nM、アンチセンスプライマーA1を200nM、0.2mM dATP、0.2mM dCTP、0.2mM dGTP、0.2mM dTTP、10mM 塩化カリウム、6mM 硫酸アンモニウム、2mM 塩化マグネシウム、0.1% (w/v) トライトンX-100、0.01mg/ml ウシ血清アルブミン、Pfu DNAポリメラーゼ(ストラタジーン社製)5単位を含む20mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.0)50μl中で、94℃で30秒、55℃で30秒、72℃で1分の条件で、30サイクルのPCRを行なった後、さらに72℃で10分間保温した。反応液を100Vでアガロースゲル電気泳動し、0.84kbpに相当するバンドのDNAを切り出した。

【0100】以上のPCRで得られた0.37kbpのDNA断片(2.5ng)および0.84kbpのDNA断片(2.5ng)を鋳型とし、センスプライマーS1を200nM、アンチセンスプライマーA1を200nM、0.2mM dATP、0.2mM dCTP、0.2mM dGTP、0.2mM dTTP、10mM 塩化カリウム、6mM 硫酸アンモニウム、2mM

塩化マグネシウム、0.1% (w/v) トライトンX-100、0.01mg/ml ウシ血清アルブミン、Pfu DNAポリメラーゼ(ストラタジーン社製)5単位を含む20mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.0)50μl中で、1サイクルあたり94℃で30秒、

24

55℃で30秒、72℃で1分の条件で、30サイクルのPCRを行った後、さらに72℃で10分間保温した。この反応液をフェノール・クロロホルム処理し、エタノール沈澱した。沈澱を風乾後、TEに溶解した。このようにして得られたDNAを制限酵素SalI、および制限酵素HindIIIで消化後、1×TBE緩衝液中で、100Vでアガロースゲル電気泳動し、1.2kbpに相当するバンドのDNAを切り出した。

【0101】上記方法により得られた1.2kbpのSalI-HindIII断片を、制限酵素SalI、およびHindIIIで消化したpCY303に、DNAライゲーションキット(宝酒造(株)社製)を用いて挿入することにより、酵母用発現プラスミドpCY339を構築した。

【0102】実施例11. 酵母の形質転換

パン酵母サッカロミセス・セレビジエKS58-2D株(ア、ss11, leu2, his1 or 3, ura3)の形質転換は、レディとマーレイの方法により行なった[Reddy, A. and Macey, F. (1993) Anal. Biochem. 208, 211-212参照]。すなわち、1コロニーのKS58-2D株を20mlのYPD培地[1% (w/v) イーストエキストラクト(ディフコ社製)、2% (w/v) バクトペプトン(ディフコ社製)を含む2% (w/v) グルコース]を含む100ml容三角フラスコに接種し、28℃、210rpm、3日間前培養した。前培養液1mlを100mlのYPD培地を含む500ml容の三角フラスコに接種し、28℃、210rpmで培養し、600nmの波長により測定した濁度が1.5になったところで、培養液を5000rpm、4℃で10分間遠心分離し、菌体を回収した。

【0103】回収した菌体に1mM EDTA・2Naを含む10mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.5)(以下「W溶液」という)を添加し、十分に菌体を洗浄後、再び5000rpm、4℃で10分間遠心分離した。沈澱に10mM 塩化カルシウム、15mM ジチオスレイトールを含むW溶液を10ml添加し、室温で20分間静置した。この懸濁液を1100rpm、4℃で5分間遠心分離し、沈澱に10mlの冷却したW溶液を添加し、よく菌体を洗浄後、再び、1100rpm、4℃で5分間遠心分離し、沈澱を2mlのW溶液中に懸濁した。該懸濁液0.2mlを採取して1.5ml容マイクロテストチューブに移し、これにプラスミドpCY339を5μg相当を添加し、よく振り混ぜた。さらに1mM EDTA・2Na、0.1M 酢酸リチウム、40% (w/v) ポリエチレングリコール(アルドリッチ社製、分子量3400)を含む10mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.0)を0.8ml添加し、よく振り混ぜた後、30℃で45分間保温した。その後、42℃、10分間保温した後、4000rpm、4℃で5分間遠心分離し、沈澱を蒸留水1ml中に懸濁した。この

(14)

特開平10-155493

25

懸濁液を4000rpm、4℃で5分間遠心分離した。

【0104】沈澱を蒸留水0.5ml中に懸濁した後、SDプレート(0.667%(w/v)イースト・ナイトロジェン・ベース(ディアコ社製)、2%(w/v)グルコース、1×アミノ酸混合液)を含む2%(w/v) *

a) 1×アミノ酸混合液:

L-トリプトファン	0.002%(w/v)
ウラシル	0.02%(w/v)
L-ヒスチジン-塩酸塩	0.002%(w/v)
L-リジン-塩酸塩	0.003%(w/v)
L-アルギニン-塩酸塩	0.002%(w/v)
L-スレオニン	0.02%(w/v)
L-メチオニン	0.002%(w/v)
L-チロシン	0.003%(w/v)
L-フェニルアラニン	0.005%(w/v)
L-イソロイシン	0.003%(w/v)
L-バリン	0.015%(w/v)
硫酸アデニン	0.002%(w/v)
L-グルタミン酸	0.01%(w/v)
L-アスパラギン酸	0.01%(w/v)
L-セリン	0.375%(w/v)

実施例12. 酵母におけるPLA1遺伝子の発現
サッカロミセス・セレビジェKS58-2D/pCY339株、およびプラスミドを有していないKS58-2D株を、それぞれ20mlのYPD培地を含む100ml容の三角フラスコに接種し、28℃、210rpmで3日間前培養した。前培養液0.5mlを完全合成培地(20mlを含む100ml容の三角フラスコに接種し、引き続き28℃、210rpmで培養した。ただし、KS58-2D株の場合は、ロイシンを培地中に最終濃度0.003%(w/v)になるように添加した。経時的に培養液の一部を採取し、15000rpmで5分間遠心分離後、上清を回収して、ホスホリパーゼ活性測定用の試料とした。

【0106】b) 完全合成培地:

チアミン塩酸塩	400μg/リットル
ビオチン	2μg/リットル
ほう酸	500μg/リットル
硫酸銅	40μg/リットル
ヨウ化カリウム	100μg/リットル
塩化第二鉄	200μg/リットル

26

* v) 寒天プレート) 上に菌体を塗抹した。このプレートを30℃で静置培養し、生育したコロニーを得た。この形質転換株をKS58-2D/pCY339と命名した。

【0105】

※硫酸マンガン	400μg/リットル
モリブデン酸ナトリウム	200μg/リットル
硫酸亜鉛	400μg/リットル
硫酸アンモニウム	0.5%(w/v)
リン酸二カリウム	0.5%(w/v)
硫酸マグネシウム	0.05%(w/v)
塩化ナトリウム	0.01%(w/v)
塩化カルシウム	0.01%(w/v)
グルコース	2%(w/v)
ガラクトース	2%(w/v)
リン酸カリウム緩衝液(pH7.6)	0.2M
ウシ血清アルブミン	0.5%(w/v)
アミノ酸混合液	3倍濃度

試験例2

実施例12で調製した試料のホスホリパーゼ活性を、試験例1に記載した方法により測定した。各試料のホスホリパーゼ活性は表2に記載する通りであった。

【0107】

【表2】

試料	培養日数(日)					
	3	5	7	10	13	17
KS58-2D(対照)	0	0	0	0	0	0
KS58-2D/pCY339	3.9	6.2	7.7	10.3	12.1	13.8

単位: U/ml

(15)

特開平10-155493

27

28

実施例13. アスペルギルス・オリゼでの発現

(1) 発現プラスミドベクターの構築

実施例7で調製したプラスミドpRAV885 3μgを制限酵素SacIで消化し、エタノール沈澱を行ってDNAを回収し、さらに制限酵素BamHIで消化後、エタノール沈澱を行ってDNAを回収した。このDNAをアガロースゲル電気泳動し、0.94kbpに相当するバンド部分のゲルを切り出し、DNAを回収した。この0.94kbp断片の末端を、DNAランディング

キットを用いて平滑化した。その後、フェノール・クロロホルム抽出を2回、エタノール沈澱を1回行ってDNAを回収した。

【0108】一方、アスペルギルス・オリゼ用発現プラスミドベクター pTAex3 [Fujii, T., et al. (1995) Biosci. Biotech. Biochem. 59, 1869-1874参照] 1.5μgを制限酵素EcoRIで消化し、エタノール沈澱を行ってDNAを回収した。このDNAの末端を、DNAランディングキットを用いて平滑化した後、フェノール・クロロホルム抽出を2回、エタノール沈澱を1回行ってDNAを回収した。さらに、このDNAの末端を

付ウシ小腸由来アルカリホスファターゼ(宝酒造(株)社製)30単位で脱リン酸化した後、フェノール・クロロホルム抽出を2回、エタノール沈澱を1回行ってDNAを回収した。

【0109】このEcoRI消化したpTAex3 DNA 1μgと、pRAV885より得た0.94kbpのBamHI-SacI断片 0.4μgとを、DNAライゲーションキットを用いて連結した。この連結反応液を用いてコンピテント大腸菌 E. coli HB 101を形質転換し、100μg/mlのアンピシリンを含むLB寒天培地(1% バクト・トリプトン、0.5% バクト・イーストエキストラクト、0.5% 塩化ナトリウム、1.5% バクト・アガー)上で生育したコロニーを選択した。このアンピシリン耐性株の中から、その保持するプラスミドDNAを制限酵素EcoRIおよびBglIIで消化した際に5.5kbp、2.3kbpおよび0.7kbpの3本の断片を生成するものを選択した。この株を大量培養し、PLA1のアスペルギルス・オリゼ用発現プラスミドベクターpAAPを調製した。

【0110】(2) アスペルギルス・オリゼの形質転換 上記(1)で調製した発現ベクターpAAPのアスペルギルス・オリゼへの導入は、五味らの方法[Gomi, K., et al. (1987) Agric. Biol. Chem. 51, 2549-2555参照]に基づいて行なった。すなわち、まずDP培地(2% デキストリン、1% ポリペプトン、0.5% リン酸1カリウム、0.05% 硫酸マグネシウム)を80ml仕込んだ500ml三角フラスコに、アスペルギルス・オリゼ M-2-3株[醸造研究所より分譲: 前出Gomi, K., et al.参照]を1白金耳接種し、30℃

で20から40時間振盪培養した。得られたベレット状の菌体をガラスフィルター3G1(ハリオ(株)社製)で濾過して回収し、滅菌水で洗浄後、水切りして50mlのコニカルチューブに入れた。この菌体に、フィルター滅菌したプロトプラスト化溶液(5mg/ml ノボザイム234(ノボ社製)、5mg/ml セルラーゼR-10(生化学工業(株)社製)、0.8M塩化ナトリウム、10mM リン酸緩衝液(pH6.0))を10ml加えて、30℃、100rpmで3時間振盪した。この反応液をガラスフィルター3G3(ハリオ(株)社製)で濾過し、濾液を0.8M塩化ナトリウム溶液で2回洗浄後、溶液I(0.8M塩化ナトリウム、10mM塩化カルシウム、10mM トリッス・塩酸(pH7.5))で洗浄し、2000rpmで5分間遠心分離して、沈澱したプロトプラストを得た。

【0111】このプロトプラストを 2.5×10^8 /mlとなるように最終容量の4/5量の溶液Iに懸濁し、これに1/5量の溶液II(40% ポリエチレングリコール4000、50mM塩化カルシウム、50mM トリッス・塩酸(pH7.5))と1/100量のジメチルスルホキシドを加えた。このプロトプラスト懸濁液0.2mlにpAAP DNA 10μgを添加して、30分氷冷した。次に、1mlの溶液IIを加えてよく混合し、20分間室温で放置した後、10mlの溶液Iを加え、2000rpmで5分間遠心分離した。沈澱したプロトプラストを適量の溶液Iに懸濁し、0.8M塩化ナトリウムを含むを含むCzapek-Dox寒天培地(0.2% 硝酸ナトリウム、0.1% リン酸2カリウム、0.05% 硫酸マグネシウム、0.05% 塩酸カリウム、0.001% 硫酸第1鉄、3% シュークロース、2% 寒天)に塗抹した。アスペルギルス・オリゼ M-2-3株はアルギニン要求性であることから、通常は最少培地であるCzapek-Dox培地で生育できず、pAAPが導入された株のみが生育できる。Czapek-Doxplate上で生育した形質転換体は、さらにCzapek-Dox培地で3回継ぎ、安定生産株アスペルギルス・オリゼ M-2-3/pAAP株を取得した。

【0112】(3) 形質転換体の培養およびPLA1活性の確認

40 スラント上に生育したアスペルギルス・オリゼ M-2-3/pAAP株より、胞子および菌糸を1白金耳かき取り、DPY培地(2% デキストリン、1%ポリペプトン、0.5% イーストエキストラクト、0.5% リン酸1カリウム、0.05% 硫酸マグネシウム、pH6.5)を80ml仕込んだ500ml三角フラスコに植菌した。これを36℃、210rpmの条件で培養し、培養開始7日目の培養上清のPLA1活性を、試験例1に記載した方法で測定した結果、少なくとも30U/mlの活性が認められた。この分泌生産量は、プラスミドを保持しないアスペルギルス・オリゼ M-2-

(16)

特開平10-155493

29

30

3株の300倍以上に相当し、PLA1遺伝子の過剰発現によりPLA1の分泌生産量が大幅に増大したことを示した。

【0113】このアスペルギルス・オリゼ M-2-3/pAAP株の培養上清 10μlを試料として、10-20%のグラジエントゲルを用いたSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を実施した。泳動終了後、ゲル中のタンパク質を転写装置（ザルトプロットII-S：ザルトリウス社製）を用いてニトロセルロース膜（アマシャム社製）に転写した。このニトロセルロース膜について、抗PLA1ウサギIgG抗体を一次抗体、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgGヤギ抗体（バイオラッド社製）を二次抗体とするウエスタンブロット解析を実施した結果、多量のPLA1が検出され、アスペルギルス・オリゼ M-2-3/pAAP株においてPLA1が大量に産生されていることが確認された。

【0114】

【発明の効果】 以上のごとく、本発明の方法によって製造される組換えタンパク質は、優れたホスホリパーゼ活性を有する。本発明により、組換えPLA1の工業的規模の製造を高収率・高純度で行うことが可能となった。

【図面の簡単な説明】

【図1】プラスミドpRAV12の制限酵素地図。

配列

ATG TTT AGT CTC GCG CGA TTG GGG ACC GTT GCA GGT CTA TTT TTA CTG	48
Met Phe Ser Leu Ala Arg Leu Gly Thr Val Ala Gly Leu Phe Leu Leu	
-26 -25 -20 -15	
GCT CAG GCT GCC CCG GCT TCA CTG CGC AGA GAT GTC AGC TCT TCC CTT	96
Ala Gln Ala Ala Pro Ala Ser Leu Arg Arg Asp Val Ser Ser Ser Leu	
-10 -5 1 5	
CTC AAT AAC CTG GAT CTC TTT GCA CAG TAC AGC GCC GCC GCA TAC TGT	144
Leu Asn Asn Leu Asp Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys	
10 15 20	
GAT GAG AAC CTG AAC TCT ACG GGG ACC AAG TTG ACA TGC TCT GTT GGC	192
Asp Glu Asn Leu Asn Ser Thr Gly Thr Lys Leu Thr Cys Ser Val Gly	
25 30 35	
AAC TGT CCT TTG GTA GAA GCG GCC TCT ACC CAA TCA TTG GAT GAA TTC	240
Asn Cys Pro Leu Val Glu Ala Ala Ser Thr Gln Ser Leu Asp Glu Phe	
40 45 50	
AAC GAA TCG TCA TCC TAC GGC AAC CCC GCC GGG TAC CTC GCC GCT GAT	288
Asn Glu Ser Ser Ser Tyr Gly Asn Pro Ala Gly Tyr Leu Ala Ala Asp	
55 60 65 70	
GAG ACT AAC AAG CTC CTA GTC CTG TCC TTC CGG GGT AGC GCT GAC TTG	336
Glu Thr Asn Lys Leu Leu Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Ala Asp Leu	
75 80 85	
GCC AAT TGG GTC GCC AAC CTG AAT TTT GGT CTC GAG GAT GCC AGC GAT	384
Ala Asn Trp Val Ala Asn Leu Asn Phe Gly Leu Glu Asp Ala Ser Asp	
90 95 100	
CTG TGT TCT GCG TGC GAA GTG CAC AGC GCC TTC TGG AAG GCA TGG AGT	432

* 【図2】プラスミドpRAV43の制限酵素地図。

【図3】プラスミドpRAV885の制限酵素地図。

【図4】プラスミドpRAV825の構築図。

【図5】プラスミドpCY339の構築図。

【図6】プラスミドpAAPの構築図。

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：888

配列の種類：核酸

10 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の型：cDNA to mRNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

起源

生物名：アスペルギルス・オリゼ (Aspergillus oryzae)

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

20 位置：1..885

特徴を表す記号：mat_peptide

位置：79..885

特徴を表す記号：sig_peptide

* 位置：1..78

(17)

特開平10-155493

3 1 3 2

Leu Cys Ser Gly Cys Glu Val His Ser Gly Phe Trp Lys Ala Trp Ser
 105 110 115

GAA ATC GCC GAC ACC ATC ACT TCC AAA GTG GAA TCA GCT TTG TCG GAT 480
 Glu Ile Ala Asp Thr Ile Thr Ser Lys Val Glu Ser Ala Leu Ser Asp
 120 125 130

CAT TCC GAT TAT TCC TTG GTC TTG ACC GGA CAT AGT TAC GGC GCT GCG 528
 His Ser Asp Tyr Ser Leu Val Leu Thr Gly His Ser Tyr Gly Ala Ala
 135 140 145 150

CTG GCA GCC CTC GCA GCG ACT GCT CTG CGG AAC TCC GGC CAT AGT GTT 576
 Leu Ala Ala Leu Ala Ala Thr Ala Leu Arg Asn Ser Gly His Ser Val
 155 160 165

GAG CTG TAC AAC TAC GGT CAA CCT CGA CTT GGA AAC GAG GCA TTG GCA 624
 Glu Leu Tyr Asn Tyr Gly Gln Pro Arg Leu Gly Asn Glu Ala Leu Ala
 170 175 180

ACA TAT ATC ACG GAC CAA AAC AAG GGT GGC AAC TAT CGC GTT ACG CAC 672
 Thr Tyr Ile Thr Asp Gln Asn Lys Gly Gly Asn Tyr Arg Val Thr His
 185 190 195

ACT AAT GAT ATT GTG CCT AAA CTG CCA CCC ACG CTG CTC GGG TAT CAC 720
 Thr Asn Asp Ile Val Pro Lys Leu Pro Pro Thr Leu Leu Gly Tyr His
 200 205 210

CAC TTC AGC CCA GAG TAC TAT ATC AGC AGC GCC GAC GAG GCA ACG GTG 768
 His Phe Ser Pro Glu Tyr Tyr Ile Ser Ser Ala Asp Glu Ala Thr Val
 215 220 225 230

ACC ACC ACT GAT GTG ACT GAG GTT ACG GGA ATC GAT GCT ACG GGC GGT 816
 Thr Thr Thr Asp Val Thr Glu Val Thr Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly
 235 240 245

AAT GAT GGA ACC GAC GGA ACT AGC ATC GAT GCT CAT CGG TGG TAC TTT 864
 Asn Asp Gly Thr Asp Gly Thr Ser Ile Asp Ala His Arg Trp Tyr Phe
 250 255 260

ATT TAT ATT AGC GAA TGT TCA TAG 888
 Ile Tyr Ile Ser Glu Cys Ser
 265

配列番号: 2

配列の長さ: 295

配列の種類: アミノ酸

* トポロジー: 直鎖状

配列の型: 蛋白質

*

配列

Met Phe Ser Leu Ala Arg Leu Gly Thr Val Ala Gly Leu Phe Leu Leu
 -26 -25 -20 -15

Ala Gln Ala Ala Pro Ala Ser Leu Arg Arg Asp Val Ser Ser Ser Leu
 -10 -5 1 5

Leu Asn Asn Leu Asp Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys
 10 15 20

Asp Glu Asn Leu Asn Ser Thr Gly Thr Lys Leu Thr Cys Ser Val Gly
 25 30 35

Asn Cys Pro Leu Val Glu Ala Ala Ser Thr Gln Ser Leu Asp Glu Phe
 40 45 50

Asn Glu Ser Ser Ser Tyr Gly Asn Pro Ala Gly Tyr Leu Ala Ala Asp
 55 60 65 70

Glu Thr Asn Lys Leu Leu Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Ala Asp Leu
 75 80 85

(18)

特開平10-155493

33 34
 Ala Asn Trp Val Ala Asn Leu Asn Phe Gly Leu Glu Asp Ala Ser Asp
 90 95 100
 Leu Cys Ser Gly Cys Glu Val His Ser Gly Phe Trp Lys Ala Trp Ser
 105 110 115
 Glu Ile Ala Asp Thr Ile Thr Ser Lys Val Glu Ser Ala Leu Ser Asp
 120 125 130
 His Ser Asp Tyr Ser Leu Val Leu Thr Gly His Ser Tyr Gly Ala Ala
 135 140 145 150
 Leu Ala Ala Leu Ala Ala Thr Ala Leu Arg Asn Ser Gly His Ser Val
 155 160 165
 Glu Leu Tyr Asn Tyr Gly Gln Pro Arg Leu Gly Asn Glu Ala Leu Ala
 170 175 180
 Thr Tyr Ile Thr Asp Gln Asn Lys Gly Gly Asn Tyr Arg Val Thr His
 185 190 195
 Thr Asn Asp Ile Val Pro Lys Leu Pro Pro Thr Leu Leu Gly Tyr His
 200 205 210
 His Phe Ser Pro Glu Tyr Tyr Ile Ser Ser Ala Asp Glu Ala Thr Val
 215 220 225 230
 Thr Thr Thr Asp Val Thr Glu Val Thr Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly
 235 240 245
 Asn Asp Gly Thr Asp Gly Thr Ser Ile Asp Ala His Arg Trp Tyr Phe
 250 255 260
 Ile Tyr Ile Ser Glu Cys Ser
 265

配列番号: 3

配列の長さ: 15

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 一本鎖

* トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

フラグメント型: 中間部フラグメント

*

配列

Gly Gly Asn Tyr Arg Val Thr His Thr Asn Asp Ile Val Pro Lys
 1 5 10 15

配列番号: 4

配列の長さ: 12

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

フラグメント型: 中間部フラグメント

配列

Ala Trp Ser Glu Ile Ala Asp Thr Ile Thr Ser Lys 40
 1 5 10

配列番号: 5

※

配列

Leu Thr Xaa Ser Val Gly Asn Xaa Pro Leu Val Glu Ala Ala Ser Thr
 1 5 10 15
 Gln Ser Leu Asp Glu Phe Asn Glu Ser Ser Ser Tyr Gly Asn Pro Ala
 20 25 30
 Gly Tyr Leu Ala Ala Xaa Glu
 35

★50★配列の長さ: 26

(19)

特開平10-155493

35

36

配列の型: アミノ酸

* 配列の種類: タンパク質

塩基数: 一本鎖

フラグメント型: 中間部フラグメント

トポロジー: 直鎖状

*

配列

Asp Val Ser Ser Ser Leu Leu Asn Asn Leu Asp Leu Phe Ala Gln Tyr
 1 5 10 15
 Ser Ala Ala Ala Tyr Xaa Asp Glu Asn Leu
 20 25

配列番号: 7

※トポロジー: 直鎖状

配列の長さ: 30

10 配列の種類: タンパク質

配列の型: アミノ酸

フラグメント型: 中間部フラグメント

鎖の数: 一本鎖

※

配列

Val Glu Ser Ala Leu Ser Asp His Ser Asp Tyr Ser Leu Val Leu Thr
 1 5 10 15
 Gly His Ser Tyr Gly Ala Ala Leu Xaa Xaa Leu Xaa Ala Thr
 20 25 30

配列番号: 8

★トポロジー: 直鎖状

配列の長さ: 17

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

配列の型: 核酸

20 ハイボセティカル: No

鎖の数: 一本鎖

★ アンチセンス: No

配列

GAYYTNTTYG CNCARTA

17

配列番号: 9

☆トポロジー: 直鎖状

配列の長さ: 16

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

配列の型: 核酸

ハイボセティカル: No

鎖の数: 一本鎖

☆ 70%: Yes

配列

SWTCRTTAA YTCRTC

16

配列番号: 10

30◆トポロジー: 直鎖状

配列の長さ: 20

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

配列の型: 核酸

ハイボセティカル: No

鎖の数: 一本鎖

◆ アンチセンス: No

配列

CGTCCTGCAC GGCATTCAAA

20

配列番号: 11

*トポロジー: 直鎖状

配列の長さ: 20

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

配列の型: 核酸

ハイボセティカル: No

鎖の数: 一本鎖

* アンチセンス: Yes

配列

TCCCTTCTCA AAGCCAGAAT

20

配列番号: 12

※トポロジー: 直鎖状

配列の長さ: 28

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

配列の型: 核酸

ハイボセティカル: No

鎖の数: 一本鎖

※ アンチセンス: No

配列

GGGTCGACAT GAAAGCATTC ACCAGTTT

28

配列番号: 13

★鎖の数: 一本鎖

配列の長さ: 40

トポロジー: 直鎖状

配列の型: 核酸

★50 配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

(20)

特開平10-155493

37

38

ハイボセティカル: No

* * アンチセンス: Yes

配列

AGAAGGGAAG AGCTGACATC AATCTTGTG ACAAGAAGCT

40

配列番号: 14

* トポロジー: 直鎖状

配列の長さ: 40

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

配列の型: 核酸

ハイボセティカル: No

鎖の数: 一本鎖

* アンチセンス: No

配列

AGCTTCGTGT CAACAAGATT GATGTCAGCT CTT
CCCTTCT

40

配列番号: 15

★ トポロジー: 直鎖状

配列の長さ: 29

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

配列の型: 核酸

ハイボセティカル: No

鎖の数: 一本鎖

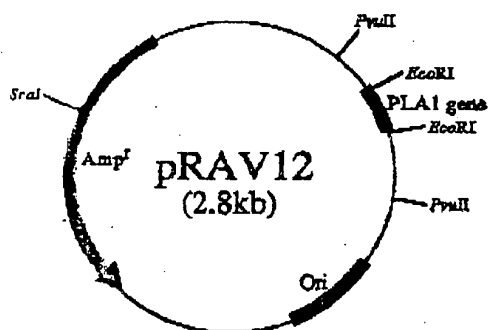
★ アンチセンス: Yes

配列

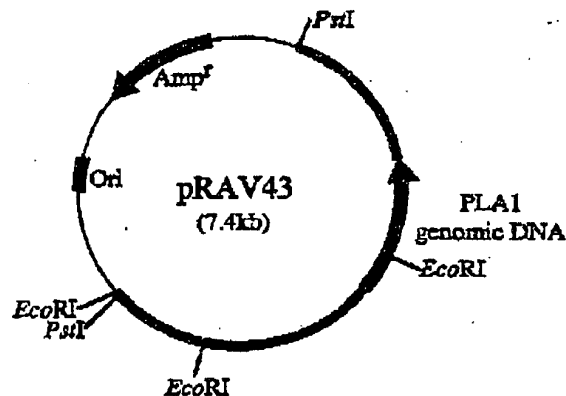
CCCAAGCTTC TATGAACATT CGCTAATAT

29

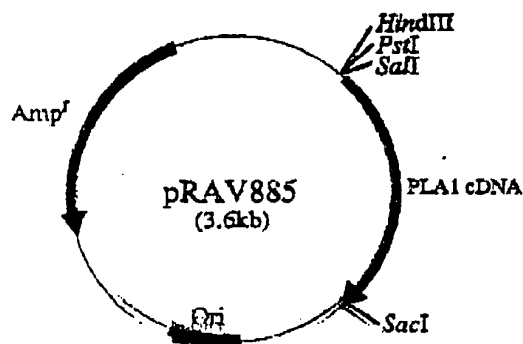
【図1】



【図2】



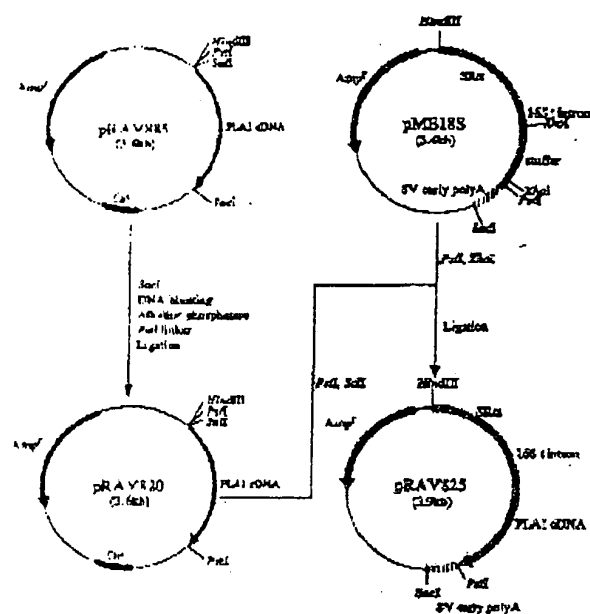
【図3】



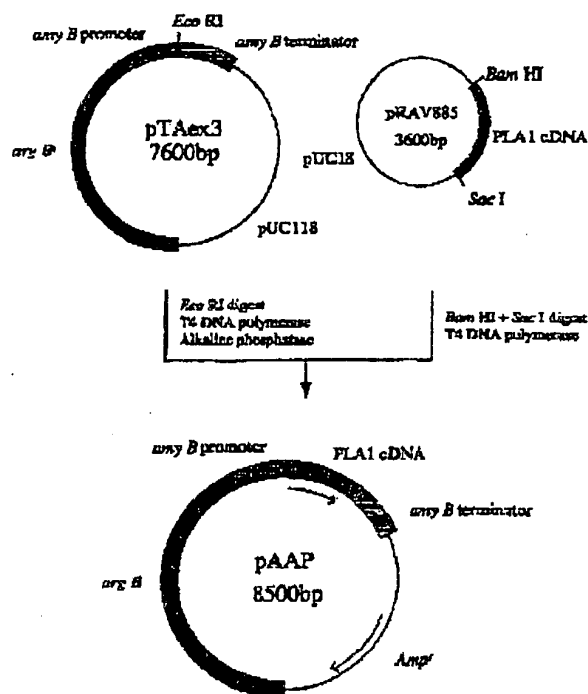
(21)

特開平10-155493

【図4】



【図5】



(23)

特開平10-155493

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁸

識別記号

FI

(C12R 1:69)

(C12N 1/19)

(C12R 1:865)

(C12N 5/10)

(C12R 1:91)

(C12N 9/16)

(C12R 1:91)

(C12N 9/16)

(C12R 1:69)

(C12N 9/16)

(C12R 1:865)

(72)発明者 津路 俊昭

東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株
式会社内

(72)発明者 芹澤 伸記

東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株
式会社内

(72)発明者 柴 陽一郎

福島県いわき市泉町下川字大廻389-4
三共株式会社内

(72)発明者 吉川 博治

福島県いわき市泉町下川字大廻389-4
三共株式会社内